تولیدات دامی
دوره ۱۸ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۵
صفحه‌های ۸۵۲-۸۴۱

# بررسی اثرات حفاظتی آلفاتوکوفرول، BSA و ویتامین C بر کیفیت اسپرم بز طی نگهداری در دمای پنج درجه سانتی‌گراد

آرش خردمند[1*]

۱. استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد – ایران

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۵/۰۱/۱۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۲/۲۸

## چکیده

در این مطالعه، بررسی اثر غلظت‌های مختلف آنتی‌اکسیدان‌های آلفاتوکوفرول، آلبومین سرم گاوی (BSA) و ویتامین C بر شاخص‌های ارزیابی اسپرم بز متعاقب ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. تیمارها شامل ۷ گروه رقیق‌کننده حاوی آلفاتوکوفرول با دو غلظت ۵ و ۱۰ واحد، BSA با دو غلظت ۴ و ۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، اسید آسکوربیک با غلظت‌های ۳ و ۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و گروه شاهد بدون افزودن ماده آنتی‌اکسیدانی بودند. در زمان های صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت، تحرک کلی و پیشرونده و نیز سلامت غشای اسپرم‌ها ارزیابی شدند. تحرک اسپرم و سلامت غشاء هنگام استفاده از رقیق‌کننده BSA با غلظت ۴ میلی‌گرم و ویتامین E با غلظت پنج واحد بیشتر از سایر رقیق‌کننده‌ها بود (P<۰/۰۵). اگرچه غلظت‌های بالاتر این ۲ آنتی‌اکسیدان باعث افزایش کمتر شاخص‌های مورد ارزیابی شد، اما نسبت به گروه شاهد بهبود نسبی را نشان دادند (P<۰/۰۵). غلظت‌های مختلف اسید آسکوربیک بر هیچ‌یک از فراسنجه‌های ارزیابی اسپرم اثر نداشت. براساس نتایج تحقیق حاضر، افزودن BSA و ویتامین E به اسپرم بز در طی فرآیند نگهداری در دمای ۵ درجه تحرک کلی و پیشرونده و نیز سلامت غشاء در طی ۴۸ ساعت را بهبود می‌بخشد.

**کلیدواژه‌ها:** آنتی‌اکسیدان، اسپرم، بز، پراکسیداسیون لیپیدی، سلامت غشاء

* نویسنده مسئول Email: arashkheradmand@yahoo.com

## مقدمه

محافظت اسپرم‌ها در سرما جهت استفاده در تلقیح مصنوعی و یا در باروری‌های داخل آزمایشگاهی یکی از فناوری‌های تولیدمثلی می‌باشد. نگهداری مایع منی به شکل سرد شده در دمای یخچال، یک روش حفاظتی مناسب برای بقای اسپرم‌ها برای مدت زمان کوتاه می‌باشد، اما روش انجماد اسپرم شامل سرد کردن، فریز و سپس ذوب آن باعث ایجاد آسیب بیشتر به اسپرم شده که علت اصلی آن تشکیل بلورهای یخ در داخل سلول، شوک ناشی از سرمای شدید و اختلالات فشار اسمزی بوده که منجر به کاهش تحرک و زنده‌مانی اسپرم و نهایتاً کاهش میزان باروری می‌گردد [۸، ۱۵ و ۲۱]. آسیب ناشی از سرد کردن منی به‌مراتب کمتر از روش انجماد و سپس ذوب اسپرم است و درنتیجه باروری حاصل از اسپرم‌های سرد شده در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد بالاتر از اسپرم‌های منجمد شده می‌باشد [۱۴].

تلقیح مصنوعی با استفاده از منی سرد شده یک روش متداول در تولیدمثل گوسفند و بز می‌باشد [۵]. باتوجه به محدودیت حجم منی مورد استفاده برای تلقیح این حیوانات در داخل گردن رحم و از طرف دیگر، به‌دلیل جلوگیری از کاهش غلظت اسپرم‌ها نمی‌توان منی آنان را خیلی رقیق نمود. به همین دلیل، استفاده از منی منجمد شده این حیوانات متداول نیست. بنابراین، نگهداری اسپرم این حیوانات در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد به منظور حفظ بیشتر تحرک و باروری اسپرم آنها جهت استفاده کوتاه‌مدت (کمتر از ۷۲ ساعت) از اهمیت به‌سزایی برخوردار است [۲].

یکی از محدودیت‌های سرد کردن اسپرم، آسیب وارده به غشای اسپرم در طی روند سرمادهی می‌باشد. از آنجا که غشای اسپرم سرشار از اسیدهای چرب غیراشباع است، بنابراین به استرس اکسیداتیو ناشی از شوک سرما که منجر به تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود، حساس می‌باشد [۱ و ۱۴]. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول اسپرم جهت پیش‌گیری از پراکسیداسیون لیپیدی غشاء کافی نیست، به همین جهت، افزودن آنتی‌اکسیدان‌های مختلف می‌تواند باعث حفظ و بهبود تحرک و زنده‌مانی اسپرم‌ها شود [۱].

ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مختلفی جهت افزودن به اسپرم بز جهت انجماد و یخ‌گشایی متعاقب آن استفاده شده است که می‌توان به سیستئین [۱ و ۱۶]، اسید آسکوربیک [۶، ۱۱ و ۱۳]، سرم آلبومین گاوی [۱ و ۱۷]، ویتامین E [۱ و ۱۸] و فولرنول [۳] اشاره نمود، اما در بسیاری از این تحقیقات، اثر آنتی‌اکسیدان‌ها بر کیفیت اسپرم متعاقب انجماد و یخ‌گشایی آن بررسی شده است. تعداد مطالعات انجام گرفته بر اثر آنتی‌اکسیدان‌ها روی شاخص‌های باروری اسپرم بز در طی نگهداری آن به شکل مایع سرد شده محدود بوده است [۶].

هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی مقایسه‌ای ۳ ترکیب آنتی‌اکسیدانی آلفاتوکوفرول (فرم فعال ویتامین E)، سرم آلبومین گاوی و اسید آسکوربیک با غلظت‌های متفاوت بر فراسنجه‌های کیفی اسپرم بز در مدت ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد بود.

## مواد و روش‌ها

ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده در این مطالعه شامل آلبومین سرم گاوی ساخت شرکت مرک (آلمان)، اسید آسکوربیک ساخت شرکت مرک (کشور آلمان) و ویتامین E ساخت شرکت داروسازی اسوه (تهران، ایران) بودند. جهت رقیق‌سازی اسپرم‌ها از محیطی بر پایه زرده تخم‌مرغ (Cat No: K93438984) به علاوه سیترات سدیم (Cat No: A686099327) هر دو ساخت شرکت مرک آلمان به نسبت ۱ به ۲ (۱ سی‌سی زرده تخم‌مرغ به علاوه ۰/۵ سی‌سی سیترات سدیم ۲/۹ درصد) حاوی آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (کاسپین تأمین، رشت، ایران) به میزان ۰/۶ گرم در لیتر استفاده شد.

برای تهیه و استحصال اسپرم، تعداد ۸ قطعه بیضه در ۳ مرحله از بزهای نر بالغ کشتار شده از کشتارگاه جمع‌آوری شدند. نمونه‌های بیضه به سرعت به آزمایشگاه منتقل و تا زمان آماده‌سازی نمونه‌ها در انکوباتور در دمای $۳۷^{\circ}C$ نگهداری شدند. برای تهیه اسپرم، دم اپی دیدیم با قیچی بریده شده و پس از جداسازی چربی و بافت‌های اضافه آن، در داخل ۶ سی‌سی سرم فیزیولوژی گرم خرد شده و جهت آزادسازی بیشتر اسپرم‌ها از قطعات خرد شده دم اپی دیدیم، نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در داخل انکوباتور در دمای $۳۷^{\circ}C$ نگهداری شدند.

از آنجا که ثابت شده جدا کردن پلاسمای منی در بز باعث بهبود تحرک و سلامت غشاء در اسپرم‌ها شده و حذف پلاسما برای ذخیره اسپرم به شکل مایع سرد شده در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد ضروری است [۱۶]. از طرف دیگر، به‌دلیل عدم سازگاری ترکیبات پلاسمای منی بز با رقیق‌کننده زرده تخم‌مرغ [۵]، لذا جمع‌آوری اسپرم در این مطالعه از طریق دم اپی دیدیم و بدون وجود ترکیبات پلاسمای منی انجام گرفت.

هفت تیمار آزمایشی عبارت بودند از: رقیق‌کننده حاوی BSA در دو غلظت ۴ و ۶ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر، اسید آسکوربیک با دو غلظت ۳ و ۶ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر، آلفاتوکوفرول در دو غلظت ۵ و ۱۰ واحد در میلی‌لیتر و گروه شاهد فاقد ترکیب آنتی‌اکسیدانی. مقادیر انتخاب شده برای آنتی‌اکسیدان‌ها براساس مطالعه قبلی محقق بر روی قوچ و با کمی تغییر در غلظت آنها به شرح مقادیر فوق انتخاب شدند [۱۲]. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه اسپرم به هر یک از تیمارها (با حجم ۲ سی‌سی) اضافه شد. پس از افزودن اسپرم به هر یک از تیمارها، نمونه‌ها در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند و فراسنجه‌های مختلف اسپرم شامل درصد تحرک کلی، درصد حرکت پیشرونده و سلامت عملکرد غشای اسپرم در ساعات صفر، ۲۴ و ۴۸ ارزیابی شدند. به دلیل کیفیت و غلظت مطلوب نمونه‌های اسپرم، هیچ‌کدام از نمونه‌های اخذ شده و رقیق شده از روند آزمایش حذف نشدند.

به منظور تخمین میزان درصد تحرک کلی و میزان حرکات پیشرونده، مقدار ۱۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم هر تیمار توسط سمپلر روی یک قطعه لام ریخته شده و با گذاشتن لامل بر روی آن گسترش نازک تهیه شده و سپس با میکروسکوپ نوری (Olympus CX 21) و با درشت‌نمایی ۴۰۰ میزان تحرک اسپرم‌ها بررسی شد. این تخمین براساس مشاهده حرکات اسپرم در نقاط مختلف لام و با شمارش حداقل ۱۰۰ اسپرم انجام می‌گرفت.

برای ارزیابی سلامت غشاء از آزمون تورم در محیط هیپواسموتیک یا HOST (Hypo-osmotic swelling test) استفاده شد [۱۹]. به‌طور خلاصه، در این روش ۱۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم به ۰/۴ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و به مدت ۵ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس یک گسترش نازک از آن تهیه و اسپرم‌ها در زیر میکروسکوپ مورد ارزیابی قرار می‌گرفتند. اسپرم‌های با دم خمیده و یا پیچ خورده تحت عنوان اسپرم‌های با غشای سالم و فعال درنظر گرفته شد که به صورت درصد بیان شدند. اسپرم‌هایی که دم آنها فاقد هر گونه خمیدگی بود، تحت عنوان اسپرم‌های با غشای معیوب درنظر گرفته شدند. در این آزمون نیز تمامی ارزیابی‌های اسپرمی انجام شده در طول مدت آزمایش توسط یک نفر و با شمارش حداقل ۱۰۰ اسپرم انجام گرفت.

داده‌های حاصل استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۱۶) برای مدل ۱ تجزیه آماری شدند. در ابتدا نرمال بودن داده‌ها بررسی و سپس ارزیابی یکنواختی واریانس‌ها با استفاده از آزمون Levene انجام شد. در ادامه مقایسه

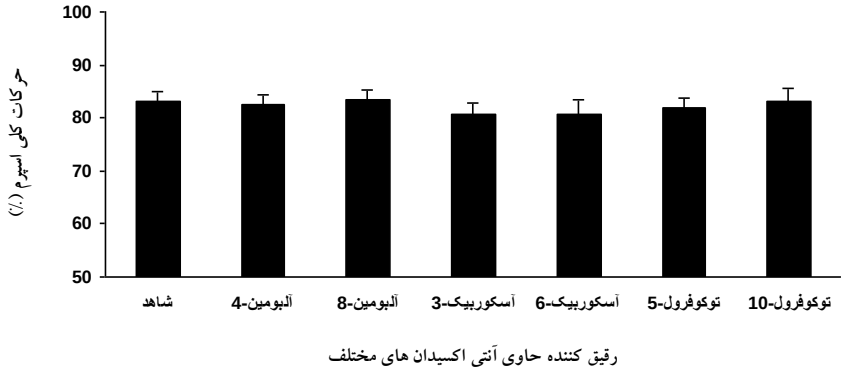
درصد تحرک کلی اسپرم‌ها، درصد حرکات پیشرونده و درصد اسپرم‌های با غشای سالم در بین ۷ گروه تیماری به تفکیک و به طور مستقل در ساعات صفر، ۲۴ و ۴۸ با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و جهت مقایسه اختلاف بین گروه‌ها نیز از آزمون توکی استفاده گردید.

رابطه (۱) $Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$

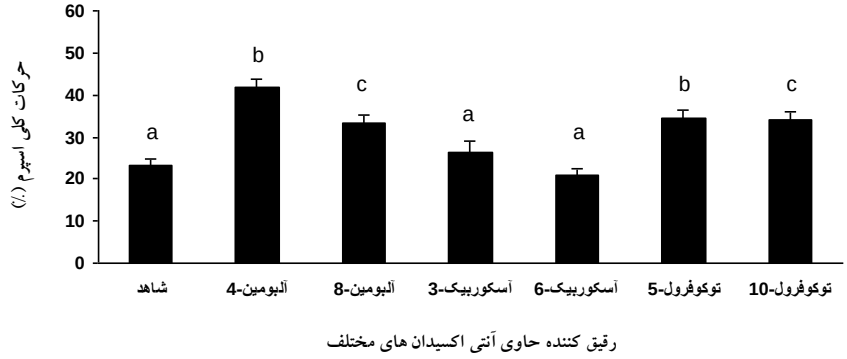
در این رابطه، $Y_{ij}$ مقدار هر یک از مشاهدات، $\mu$ میانگین کل، $\tau_i$ اثر تیمار و $\varepsilon_{ij}$ خطای آزمایش است.

## نتایج و بحث

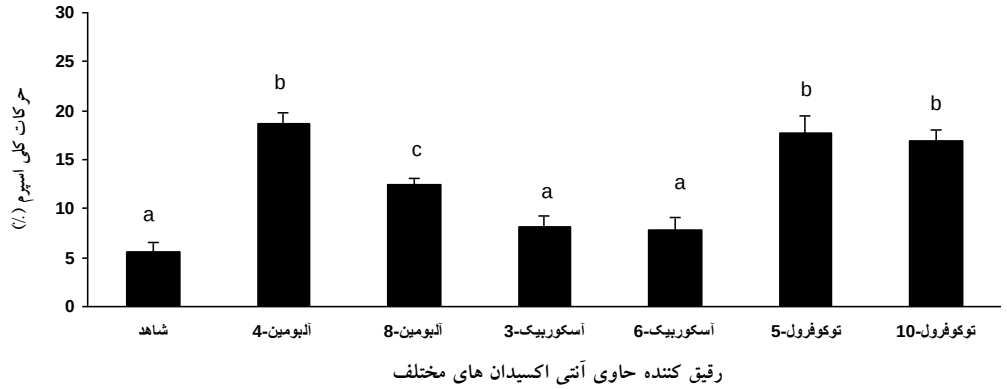
میزان تحرک کلی اسپرم‌ها در رقیق‌کننده حاوی آنتی‌اکسیدان‌های مختلف در ساعات صفر، ۲۴ و ۴۸ پس از اضافه شدن اسپرم‌ها در شکل‌های ۱، ۲ و ۳ آورده شده است. میزان تحرک اسپرم‌ها در بین گروه‌های مختلف در ساعت صفر تفاوت معنی‌داری نداشتند. با گذشت زمان، از تحرک اسپرم‌ها کاسته شده و در ساعت ۲۴ در گروه کنترل به ۲۳/۲۵ درصد رسید.




**شکل ۱ . اثر تیمارهای آزمایشی بر درصد حرکت کلی اسپرم‌های بز در ساعت صفر (میانگین ± خطای استاندارد)**
**(آلبومین-۴ و آلبومین-۸ به‌ترتیب رقیق‌کننده حاوی ۴ و ۸ میلی‌گرم BSA در میلی‌لیتر، آسکوربیک-۳ و آسکوربیک-۶ رقیق‌کننده حاوی ۳ و ۶ میلی‌گرم ویتامین C در میلی‌لیتر، توکوفرول-۵ و توکوفرول-۱۰ رقیق‌کننده حاوی ۵ و ۱۰ میلی‌گرم آلفاتوکوفرول در میلی‌لیتر)**




**شکل ۲ . اثر تیمارهای آزمایشی بر درصد حرکت کلی اسپرم‌های بز در ساعت ۲۴ (میانگین ± خطای استاندارد)**
**a-c: تفاوت میانگین‌های با حروف نامشابه در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۵).**
**(آلبومین-۴ و آلبومین-۸ به‌ترتیب رقیق‌کننده حاوی ۴ و ۸ میلی‌گرم BSA در میلی‌لیتر، آسکوربیک-۳ و آسکوربیک-۶ رقیق‌کننده حاوی ۳ و ۶ میلی‌گرم ویتامین C در میلی‌لیتر، توکوفرول-۵ و توکوفرول-۱۰ رقیق‌کننده حاوی ۵ و ۱۰ میلی‌گرم آلفاتوکوفرول در میلی‌لیتر)**




**شکل ۳ . اثر تیمارهای آزمایشی بر درصد حرکت کلی اسپرم‌های بز در ساعت ۴۸ (میانگین ± خطای استاندارد)**

**a-c: تفاوت میانگین‌های با حروف نامشابه در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۵).**

**(آلبومین-۴ و آلبومین-۸ به‌ترتیب رقیق‌کننده حاوی ۴ و ۸ میلی‌گرم BSA در میلی‌لیتر، آسکوربیک-۳ و آسکوربیک-۶ رقیق‌کننده حاوی ۳ و ۶ میلی‌گرم ویتامین C در میلی‌لیتر، توکوفرول-۵ و توکوفرول-۱۰ رقیق‌کننده حاوی ۵ و ۱۰ میلی‌گرم آلفاتوکوفرول در میلی‌لیتر)**

در میان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مختلف، رقیق‌کننده حاوی ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA به‌طور معنی‌داری باعث افزایش تحرک کلی اسپرم‌ها نسبت به گروه شاهد شد (P<۰/۰۵). اگرچه غلظت ۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر این آنتی‌اکسیدان نتوانست همانند غلظت کمتر آن باعث حفظ میزان تحرک اسپرم‌ها شود (۳۳/۳۸ به‌جای ۴۱/۸۸ درصد)، اما در عین حال این میزان همچنان نسبت به گروه شاهد بالاتر بود (P<۰/۰۵).

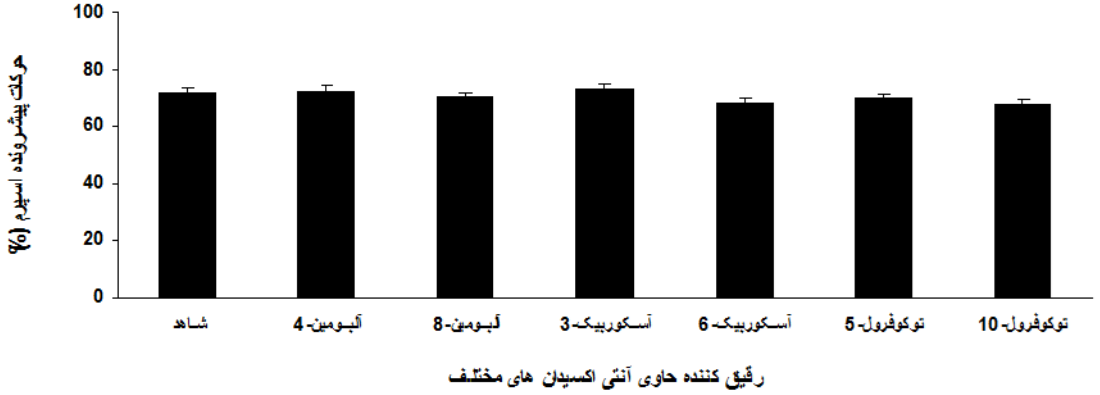
به‌نظر می‌رسد افزودن غلظت‌های مختلف اسید آسکوربیک نتوانست مانع افت درصد حرکات کلی اسپرم‌ها نسبت به گروه کنترل شود و میزان این نوع حرکات تفاوت چشم‌گیری را در مقایسه با گروه کنترل از خود نشان نداد. نکته قابل توجه دیگر اینکه اگرچه میانگین حرکات TSM در گروه ویتامین E در هر دو غلظت آن بالاتر از گروه شاهد بود (P<۰/۰۵)، اما این میزان همچنان کمتر از گروه BSA با غلظت ۴ میلی‌گرم بود (شکل ۲).

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که ویتامین C نقش ضعیف و غیرمعنی‌داری را در حفظ و بقای حرکات و سلامت غشای اسپرم بز درمقایسه با دیگر آنتی‌اکسیدان‌ها دارد که این یافته با مطالعه قبلی محقق در اسپرم‌های قوچ نیز هم‌خوانی دارد که طی آن در نگهداری اسپرم‌های قوچ به شکل سرد شده به‌مدت ۷۲ ساعت، اسید آسکوربیک نتوانسته بود تغییرات معنی‌داری را در حفظ شاخص‌های ارزیابی اسپرم ایجاد نماید [۱۲] و علی‌رغم افزایش غلظت این ویتامین در بز نسبت به مطالعه قبلی قوچ، باز هم نتوانست نقش معنی‌داری را ایفا نماید. هم جهت با نتایج مطالعه حاضر، نتایج مطالعه دیگری در مورد اسب نیز نشان داد افزودن ویتامین C به رقیق‌کننده‌های اسپرم سرد شده این حیوان به‌مدت ۹۶ ساعت نمی‌تواند باعث بهبود و یا حفظ حرکات اسپرم شود [۷]. اگرچه در تحقیقی دیگر، متعاقب افزودن اسید آسکوربیک به اسپرم نریان همین نتایج در خصوص تحرک اسپرم‌ها به‌دست آمد، اما در عین حال توانسته بود باعث افزایش سلامت غشای اسپرم در منی سرد شده این حیوان گردد [۴]. همچنین، افزودن ۵۰ میکروگرم اسید آسکوربیک به اسپرم اپیدیدیمی بز توانسته در طی مدت یک ساعت باعث بهبود حرکات اسپرم گردد

و پس از آن یا باعث کاهش و یا عدم تغییر معنی‌دار در حرکات اسپرم گردد [۶] که تا حد زیادی با مطالعه حاضر مبنی بر عدم تغییر در حرکات اسپرم در ساعات ۲۴ و ۴۸ تطابق دارد.

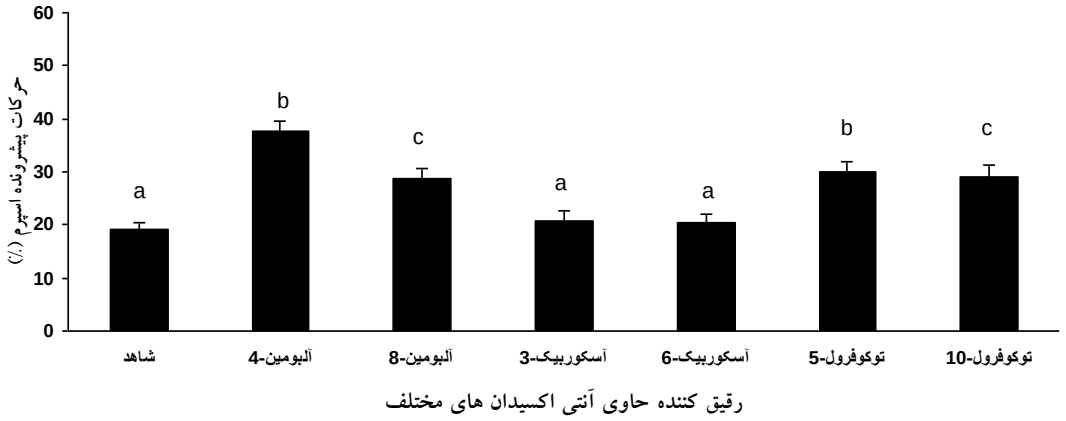
بیشتر مطالعات انجام شده بر روی اسپرم‌های بز، بررسی و ارزیابی اثرات آنتی‌اکسیدان‌ها بر شاخص‌های ارزیابی اسپرم متعاقب انجماد و سپس ذوب اسپرم در این حیوان می‌باشد. به عنوان مثال، محققان نتایج مثبتی را با افزودن اسید آسکوربیک بر میزان تحرک و سلامت غشای اسپرم‌های بز طی روند انجماد و یخ‌گشایی مشاهده نموده‌اند [۱۳]. شاید بتوان علت تفاوت مطالعه حاضر با این مطالعه را در نحوه نگهداری اسپرم (سرد شده در دمای ۵ درجه و یا منجمد کردن در ازت مایع در کنار استفاده از مواد محافظت‌کننده از سرما) دانست، زیرا در حالت نگهداری به شکل سرد شده، متابولیسم اسپرم‌ها تا حد زیادی بالا باقی می‌ماند، اما در حالت انجماد در ازت مایع متابولیسم اسپرم به صفر می‌رسد که البته مطالعات تکمیلی در این زمینه ضروری به‌نظر می‌رسد.

در ساعت ۴۸ نیز افت شدید میزان حرکات کلی اسپرم‌ها تداوم داشته که این بار نیز رقیق‌کننده حاوی BSA به‌ویژه با غلظت ۴ میلی‌گرم و نیز ویتامین E در هر دو غلظت آن تفاوت بالاتری را در مقایسه با گروه کنترل از خود نشان دادند (P<۰/۰۵) (شکل ۳). میانگین درصد حرکات پیشرونده اسپرم (FPM) در رقیق‌کننده حاوی غلظت‌های مختلف آنتی‌اکسیدان‌ها در ساعات مختلف مطالعه در شکل‌های ۴، ۵ و ۶ آورده شده است. در ساعت صفر، میانگین‌ها در کلیه گروه‌ها تفاوت معنی‌داری را با یکدیگر نشان ندادند، اما با افت محسوس درصد حرکات پیشرونده اسپرم در ساعت ۲۴، گروه رقیق‌کننده‌های حاوی BSA و ویتامین E با غلظت‌های به‌ترتیب ۴ میلی‌گرم و ۵ واحد بودند که بیش از بقیه گروه‌ها باعث حفظ و افزایش حرکات پیشرونده نسبت به گروه کنترل بودند (P<۰/۰۵). اگرچه میانگین درصد FPM در گروه ویتامین E کمتر از BSA بود (۳۰/۱۲ در مقابل ۳۷/۷۵ درصد)، اما این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار نبود.




**شکل ۴ . اثر تیمارهای آزمایشی بر درصد حرکات پیشرونده اسپرم‌های بز در ساعت صفر (میانگین ± خطای استاندارد)**

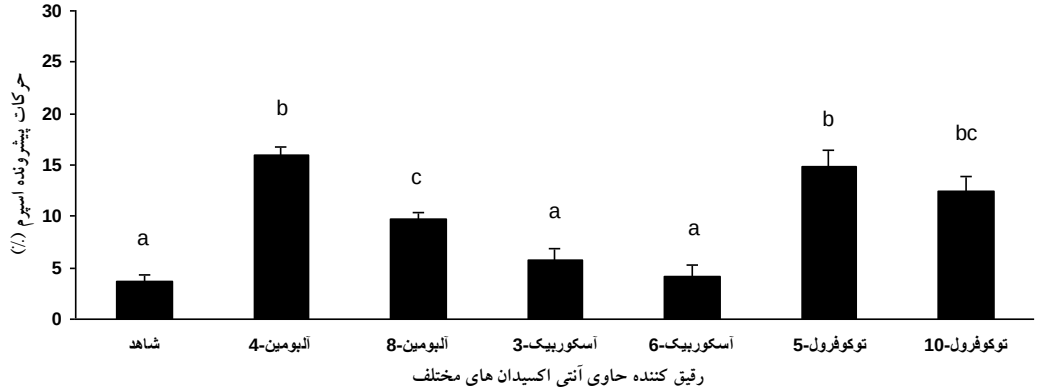
**(آلبومین-۴ و آلبومین-۸ به‌ترتیب رقیق‌کننده حاوی ۴ و ۸ میلی‌گرم BSA در میلی‌لیتر، آسکوربیک-۳ و آسکوربیک-۶ رقیق‌کننده حاوی ۳ و ۶ میلی‌گرم ویتامین C در میلی‌لیتر، توکوفرول-۵ و توکوفرول-۱۰ رقیق‌کننده حاوی ۵ و ۱۰ میلی‌گرم آلفاتوکوفرول در میلی‌لیتر)**




**شکل ۵ . اثر تیمارهای آزمایشی بر درصد حرکات پیشرونده اسپرم‌های بز در ساعت ۲۴ (میانگین ± خطای استاندارد)**

**a-c: تفاوت میانگین‌های با حروف نامشابه در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۵).**

**(آلبومین-۴ و آلبومین-۸ به‌ترتیب رقیق‌کننده حاوی ۴ و ۸ میلی‌گرم BSA در میلی‌لیتر، آسکوربیک-۳ و آسکوربیک-۶ رقیق‌کننده حاوی ۳ و ۶ میلی‌گرم ویتامین C در میلی‌لیتر، توکوفرول-۵ و توکوفرول-۱۰ رقیق‌کننده حاوی ۵ و ۱۰ میلی‌گرم آلفاتوکوفرول در میلی‌لیتر)**




**شکل ۶ . اثر تیمارهای آزمایشی بر درصد حرکات پیشرونده اسپرم‌های بز در ساعت ۴۸ (میانگین ± خطای استاندارد)**

**a-c: تفاوت میانگین‌های با حروف نامشابه در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۵).**

**(آلبومین-۴ و آلبومین-۸ به‌ترتیب رقیق‌کننده حاوی ۴ و ۸ میلی‌گرم BSA در میلی‌لیتر، آسکوربیک-۳ و آسکوربیک-۶ رقیق‌کننده حاوی ۳ و ۶ میلی‌گرم ویتامین C در میلی‌لیتر، توکوفرول-۵ و توکوفرول-۱۰ رقیق‌کننده حاوی ۵ و ۱۰ میلی‌گرم آلفاتوکوفرول در میلی‌لیتر)**

تحقیق حاضر به عنوان یکی از معدود مطالعات انجام شده درخصوص اثرات مقایسه‌ای ۳ آنتی‌اکسیدان مختلف با غلظت‌های متفاوت جهت حفظ و نگهداری اسپرم‌های بز به شکل مایع در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد نگهداری اسپرم‌های بز به شکل سرد شده در دمای ۵ درجه به مدت ۴۸ ساعت، باعث افت شدید و معنی‌دار کلیه پارامترهای ارزیابی اسپرم می‌شود. صرف‌نظر از غلظت آنتی‌اکسیدان‌ها، هم اثرات

مثبت و هم نتایج بدون اثر با افزودن این ترکیبات به‌دست آمد. به‌طوری‌که در میان آنتی‌اکسیدان‌های مورد استفاده، BSA با غلظت ۴ میلی‌گرم و در مرحله بعد ویتامین E با غلظت ۵ واحد در هر میلی‌لیتر، بیش از بقیه آنتی‌اکسیدان‌ها در حفظ فراسنجه‌های ارزیابی باروری اسپرم بز مؤثر بودند.

یکی دیگر از آنتی‌اکسیدان‌های مورد استفاده جهت حفاظت اسپرم‌ها در برابر شوک سرمایی BSA می‌باشد. این ماده ممکن است به عنوان سوبسترای انرژی و یا خنثی‌کننده یون‌ها و مولکول‌های کوچک عمل کند. BSA ممکن است به زنده ماندن اسپرم‌ها در دستگاه تناسلی گاو ماده پیش از لقاح کمک کند و یا از طریق افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز باعث افزایش باروری متعاقب انجماد و یخ‌گشایی در منی گاو گردد [۹]. BSA همچنین در ترشحات دستگاه تناسلی یافت شده و می‌تواند به حفظ تحرک اسپرم و سلامت آکروزوم اسپرم بز در طی روند انجماد کمک کند [۲۴]. اخیراً در مطالعه‌ای به اثرات حفاظتی BSA بر روی اسپرم‌های بز طی روند انجماد و یخ‌گشایی پی برده شده است [۱]. BSA نیز می‌تواند باعث حفظ تمامیت غشای اسپرم خرگوش، نگهداری شده به شکل مایع در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد شود، اما نتوانسته بود باعث بهبود میزان تحرک اسپرم در این حیوان گردد [۱۷].

cAMP نقش مهمی در تحرک دم اسپرم دارد و احتمالاً BSA از طریق فسفوریلاسیون پروتئین تایروزین روی تحرک اسپرم عمل می‌نماید. همچنین، BSA با غلظت بالا از طریق تغییر در ترکیب لیپیدهای غشای سلولی به‌ویژه با کاهش نسبت کلسترول به فسفولیپید در غشای اسپرم، منجر به نفوذپذیری یون‌های کلسیم به درون غشای پلاسمایی اسپرم شده و درنتیجه منجر به شروع واکنش آکروزومی و مرگ اسپرم می‌گردد [۲۲]. شاید به همین دلیل هم در مطالعه حاضر، غلظت بالاتر BSA (۸ میلی‌گرم) از طریق لیپید پراکسیداسیون و نفوذپذیرتر کردن غشاء، اثرات مطلوب کمتری را نسبت به غلظت پایین‌تر آن از خود نشان داد. اگرچه در مطالعه حاضر، میزان اپوپتوز در اسپرم‌ها متعاقب افزودن آنتی‌اکسیدان‌های مختلف ارزیابی نشد، اما افزودن BSA با غلظت ۵ میلی‌گرم باعث کاهش آسیب به DNA اسپرم خرگوش در طی نگهداری اسپرم آن تا ۷۲ ساعت در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد شده است [۱۷].

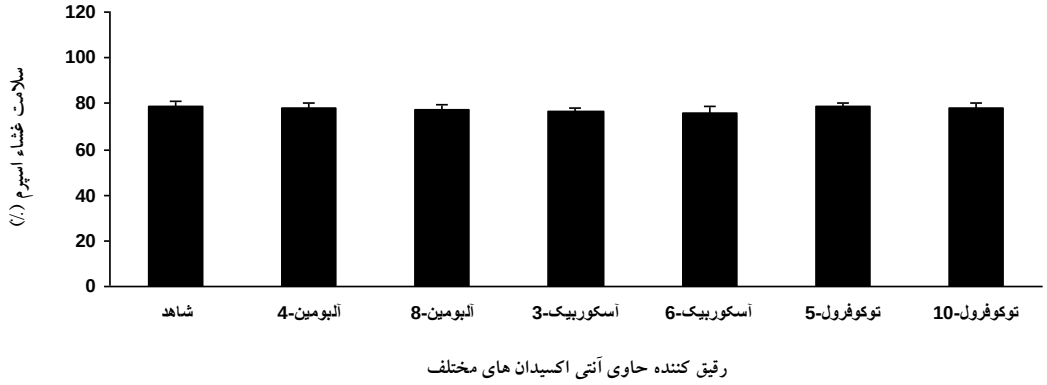
در مطالعه حاضر، هر دو غلظت BSA مورد استفاده به‌ویژه غلظت کمتر آن (۴ میلی‌گرم)، توانست کلیه شاخص‌های ارزیابی اسپرم بز اعم از تحرک و هم سلامت غشاء را بیش از بقیه آنتی‌اکسیدان‌ها در طی ۴۸ ساعت افزایش دهد (شکل ۶). نتیجه حاصل از این مطالعه تا حدودی با نتایج دیگر مطالعات هم‌خوانی دارد [۱۲]، به‌طوری‌که در مطالعه قبلی نیز BSA باعث افزایش شاخص‌های تحرک و سلامت غشاء (طی رنگ‌آمیزی با ائوزین نیگروزین) شده بود، اگرچه BSA نتوانسته بود همانند ویتامین E نقش چندان قدرتمندی در حفظ و بهبود شاخص‌های اسپرم قوچ از خود نشان دهد. لازم به‌ذکر است که در تحقیق گذشته، جهت بررسی سلامت غشاء از آزمون HOS استفاده نشده بود که به مراتب دقیق‌تر از رنگ‌آمیزی اسپرم با ائوزین-نیگروزین می‌باشد.

در اینجا نیز هر دو غلظت ویتامین C نتوانسته بود باعث حفظ میزان FPM نسبت به گروه کنترل چه در ساعت ۲۴ و چه در ساعت ۴۸ گردد ($P>0/05$). از طرف دیگر، غلظت‌های بالاتر BSA (۸ میلی‌گرم) و ویتامین E (۱۰ واحد) باعث افزایش کمتر، اما معنی‌دار میزان حرکات پیشرونده اسپرم در مقایسه با غلظت‌های کمتر همین آنتی‌اکسیدان‌ها در ساعت ۲۴ و نیز در ساعت ۴۸ پس از انکوباسیون در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد شده بود ($P<0/05$).

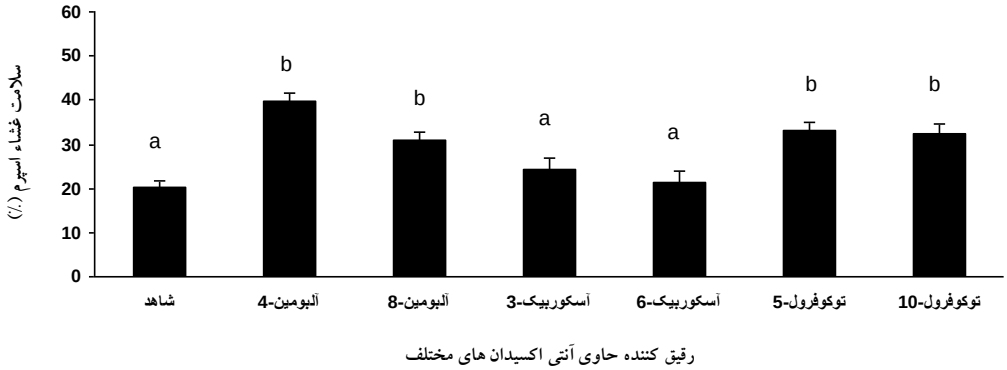
نتایج میانگین درصد سلامت غشای اسپرم به لحاظ

عملکردی (HOST) در شکل‌های ۷، ۸ و ۹ نشان داده شده است. در نتایج این آزمون نیز همانند دو شاخص قبلی، در ساعت صفر تفاوت معنی‌داری در بین گروه‌ها مشاهده نشد. در ساعات ۲۴ و ۴۸ همزمان با افت شدید این شاخص در تمام تیمارها، گروه رقیق‌کننده حاوی BSA و ویتامین E بودند که باعث افزایش معنی‌دار این پارامتر نسبت به گروه کنترل شدند (P<۰/۰۵). اگرچه غلظت‌های بالاتر BSA و ویتامین E به اندازه غلظت‌های کمتر این ۲ آنتی‌اکسیدان نتوانسته بودند باعث حفظ سلامت غشای اسپرم شوند (علی‌رغم افت ۹ درصدی در گروه BSA با غلظت ۸ میلی‌گرم)، اما همچنان حتی در غلظت‌های بالاتر نیز افزایش میزان درصد آزمون HOS نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (P<۰/۰۵).

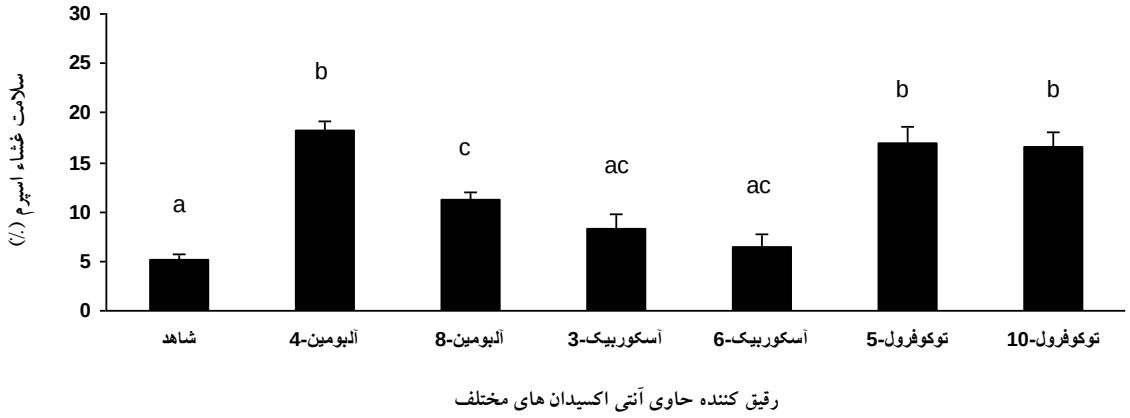
فراسنجه‌های ارزیابی شده اسپرم در هر دو غلظت اسید آسکوربیک علی‌رغم میانگین مختصر بالاتر درصد اسپرم‌های با آزمون HOS مثبت نسبت به گروه شاهد در ساعات مختلف آزمایش، نتوانسته بودند تغییرات معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد از خود نشان دهند (شکل‌های ۸ و ۹).




**شکل ۷ . اثر تیمارهای آزمایشی بر درصد سلامت غشای اسپرم‌های بز در ساعت صفر (میانگین ± خطای استاندارد)**
**(آلبومین-۴ و آلبومین-۸ به‌ترتیب رقیق‌کننده حاوی ۴ و ۸ میلی‌گرم BSA در میلی‌لیتر، آسکوربیک-۳ و آسکوربیک-۶ رقیق‌کننده حاوی ۳ و ۶ میلی‌گرم ویتامین C در میلی‌لیتر، توکوفرول-۵ و توکوفرول-۱۰ رقیق‌کننده حاوی ۵ و ۱۰ میلی‌گرم آلفاتوکوفرول در میلی‌لیتر)**




**شکل ۸ . اثر تیمارهای آزمایشی بر درصد سلامت غشای اسپرم‌های بز در ساعت ۲۴ (میانگین ± خطای استاندارد)**
**a-b: تفاوت میانگین‌های با حروف نامشابه در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۵).**
**(آلبومین-۴ و آلبومین-۸ به‌ترتیب رقیق‌کننده حاوی ۴ و ۸ میلی‌گرم BSA در میلی‌لیتر، آسکوربیک-۳ و آسکوربیک-۶ رقیق‌کننده حاوی ۳ و ۶ میلی‌گرم ویتامین C در میلی‌لیتر، توکوفرول-۵ و توکوفرول-۱۰ رقیق‌کننده حاوی ۵ و ۱۰ میلی‌گرم آلفاتوکوفرول در میلی‌لیتر)**




**شکل ۹ . اثر تیمارهای آزمایشی بر درصد سلامت غشای اسپرم‌های بز در ساعت ۴۸ (میانگین ± خطای استاندارد)**

**a-c: تفاوت میانگین‌های با حروف نامشابه در هر ستون معنی‌دار است (P<۰/۰۵).**

**(آلبومین-۴ و آلبومین-۸ به‌ترتیب رقیق‌کننده حاوی ۴ و ۸ میلی‌گرم BSA در میلی‌لیتر، آسکوربیک-۳ و آسکوربیک-۶ رقیق‌کننده حاوی ۳ و ۶ میلی‌گرم ویتامین C در میلی‌لیتر، توکوفرول-۵ و توکوفرول-۱۰ رقیق‌کننده حاوی ۵ و ۱۰ میلی‌گرم آلفاتوکوفرول در میلی‌لیتر)**

بررسی میزان تحرک اسپرم به تنهایی جهت ارزیابی قدرت زنده‌مانی اسپرم پس از سرد یا منجمد کردن کافی نیست. سلامت غشای اسپرم به لحاظ عملکردی (ارزیابی شده توسط آزمون HOST)، اهمیت به‌سزایی در روند باروری داشته و لذا سنجش فعالیت غشاء می‌تواند به عنوان یک معیار جهت قابلیت باروری اسپرم درنظر گرفته شود [۱ و ۲۳]. اسپرم‌های با تحرک بالا می‌توانند دچار آسیب غشاء از لحاظ عملکردی و همچنین از لحاظ ساختاری شده و یا برعکس، اسپرم‌های غیرمتحرک یا کم‌تحرک می‌توانند غشای سالم داشته و لذا زنده بمانند. بنابراین، استفاده تلفیقی از این ۲ آزمون (ارزیابی تحرک همراه با آزمون HOS) جهت ارزیابی دقیق‌تر کیفیت اسپرم ضروری به‌نظر می‌رسد [۱].

استرس اکسیداتیو یکی از عوامل مؤثر در کاهش باروری در زمان ذخیره‌سازی اسپرم ناشی از شوک سرمایی است که عمدتاً از طریق تأثیر بر غشای سرشار از اسیدهای چرب غیراشباع اسپرم موجب اختلال در کار غشاء و درنتیجه کاهش تحرک آن می‌شود. تلاش در جهت افزودن مواد آنتی‌اکسیدانی مختلف به رقیق‌کننده‌های اسپرم در جهت جلوگیری و یا کاهش این روند است [۱۰]. ویتامین E در جهت تثبیت اسیدهای چرب غیراشباع سلول در برابر استرس‌های اکسیداتیو عمل کرده و ضمن خنثی کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن، باعث حفظ و پایداری سلامت غشای سلول به لحاظ عملکردی و هم ساختاری می‌شود [۱۸].

اثرات مفید ویتامین E بر بازدهی تولیدمثلی به‌ویژه به شکل افزودنی به خوراک طیور و یا انسان به‌طور گسترده‌ای بررسی شده است. از طرف دیگر، استفاده از این ویتامین جهت تثبیت غشای اسپرم در طی استرس اکسیداتیو ناشی از سرما به‌ویژه انجماد و ذوب بیشتر مطالعه شده است. به عنوان مثال، افزودن ۱۲۰ میکرومول از ویتامین E به رقیق‌کننده منی اسب، باعث بهبود حرکات کلی و نیز پیشرونده اسپرم پس از ذوب شده است. همچنین، اخیراً افزودن ۶۰ یا ۱۲۰ میکرومول از ویتامین E، باعث افزایش سلامت غشای اسپرم و میتوکندری‌ها و نیز کلیه فراسنجه‌های حرکتی اسپرم قوچ متعاقب انجماد و یخ‌گشایی شده است [۱۸]. افزودن ویتامین E به اسپرم سرد

شده قوچ، باعث بهبود کیفیت شاخص‌های ارزیابی اسپرم در این حیوان می‌شود [۱۲]. نتیجه مشابهی نیز در مطالعه حاضر در بز به‌دست آمد و افزودن ویتامین E به‌ویژه با غلظت ۵ واحد در میلی‌لیتر به‌طور معنی‌داری پارامترهای ارزیابی شده اسپرم بز را افزایش می‌دهد.

براساس نتایج حاصل افزودن ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA با غلظت و ۵ واحد ویتامین E سبب حفظ تحرک و سلامت غشای اسپرم بز طی ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد می‌گردد. لذا، استفاده از این آنتی‌اکسیدان‌ها جهت حفظ کیفت منی بز به شکل مایع سرد شده توصیه می‌شود.

## منابع


1. Anghel A, Zamfirescu S, Dragomir C, Nadolu D, Elena S and Florica B (2010) The effects of antioxidants on the cytological parameters of cryopreserved buck semen. Romanian Biotechnological Letters. 15: 26-32.

2. Arthur GH, Noakes DE, Pearson H and Parkinson TJ (1996) Veterinary Reproduction and Obstetrics. 7th Edition. W.B. Saunders Company, London. Pp. 634-647.

3. Arul-Murugan A, Gangadharan B and Mathur PP (2002) Antioxidative effect of fullerenol on goat epididymal spermatozoa. Asian Journal of Andrology. 4: 149-152.

4. Aurich JE, Schonherr U, Hoppe H and Aurich C (1997) Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled stored stallion semen. Theriogenology. 48: 185-192.

5. Ax RL, Dally MR, Didon BA, Lenz RW, Love CC, Varner DD, Hafez B and Bellin ME (2000) Artificial insemination. in: Reproduction in Farm Animals. 7th Edition. Lea and Febiger, Philadelphia. Pp. 376-389.

6. Babaei H and Sivandi S (2014) The effects of *in vitro* supplementation of capacitation medium with ascorbic acid on kinetic parameters of caprine epididymal sperm. Comparative Clinical Pathology. 23: 63-68.

7. Ball BA, Medina V, Gravance CG and Baumber J (2001) Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. Theriogenology. 56: 577-589.

8. Barbas JB and Mascarenhas RD (2009) Cryopreservation of domestic animal sperm cells. Cell Tissue Bank. 10: 49-62.

9. Chen Y, Foote RH and Brockett CC (1993) Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. Cryobiology. 30: 423-431.

10. Gadea J, Garcıa-Vazquez F, Matas C, Gardon JC, Canovas S and Gumbao D (2005) Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. Journal of Andrology. 26: 396-404.

11. Gangadharan B, Arul Murugan A and Mathur PP (2001) Effect of methoxychlor on antioxidant system of goat epididymal sperm *in vitro*. Asian Journal of Andrology. 3: 285-288.

12. Kheradmand A, Babaei H and Abshenas J (2006) Comparative evaluation of the effect of antioxidants on the chilled-stored ram semen. Iranian Journal of Veterinary Research. 7: 40-45.

13. Memon AA, Wahid H, Rosnina Y, Goh YM, Ebrahimi M and Nadia FM (2013) Effect of Ascorbic Acid Concentrations, Methods of Cooling and Freezing on Boer Goat Semen Cryopreservation. Reproduction in Domestic Animals. 48: 325-330.

14. Paulenz H, Soderquist L, Adnoy T, Soltun K, Saether PA and Fjellsoy KR (2005) Effect of cervical and vaginal insemination with liquid semen stored at room temperature on fertility of goats. Animals Reproduction Science. 86: 109-117.

15. Salamon S and Maxwell WM (2000) Storage of ram semen. Animal Reproduction Science. 62: 77-111.

16. Salvador I, Yaniz J, Viudes-de-Castro MP, Gomez EA and Silvestre MA (2006) Effect of solid storage on caprine semen conservation at $5^{\circ C}$. Theriogenology. 66: 974-981.

17. Sariozkan S, Turk G, Canturk F, Yay A, Eken A and Akcay A (2013) The effect of bovine serum albumin and fetal calf serum on sperm quality, DNA fragmentation and lipid peroxidation of the liquid stored rabbit semen. Cryobiology. 67: 1-6.

18. Silva SV, Soares AT, Batista AM, Almeida FC, Nunes JF, Peixoto CA and Guerra MMP (2013) Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. Animal Reproduction Science. 137: 37-44.

19. Sliwa L and Macura B (2005) Evaluation of cell membrane integrity of spermatozoa by hypoosmotic swelling test-water test in mice after intraperitoneal daidzein administration. Archives of Andrology. 51: 443-448.

20. Swain DK, Swarnkar P, Kumar J and Yadav S (2012) Evaluation of in vitro longevity of caprine cauda epididymal sperms at different storage intervals of time. Indian Journal of Animal Science. 82: 1347-1350.

21. Vishwanath R and Shannon P (2000) Storage of bovine semen in liquid and frozen state. Animal Reproduction Science. 62: 23-53.

22. Usal O and Bucak MN (2007) Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed rem semen. Acta Veterinary. 76: 383-390.

23. Usal O, Korkmaz T, Yavas I and Bucak NM (2006) Evaluation by hypoosmotic swelling – eosine test of cryopreserved bovine spermatozoa. Indian Veterinary Journal. 83: 557-559.

24. Yamashiro H, Wang H, Yamashita Y, Kumamoto K and Terada T (2006) Enhanced freezability of goat spermatozoa collected into tubes containing extender supplemented with bovine serum albumin. Journal of Reproduction and Development. 52: 407-414.